CE

DuoFLEX Cocktail
Anti-CD3
Anti-CD20cy
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IK002

English

Intended use

For in vitro diagnostic use.

DuoFLEX Cocktail Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3 and Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy Clone L26, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3 antibody is useful for the identification of T cells and related neoplasms (1,2). Anti-Human CD20cy antibody labels cells of the B-cell lineage, and is useful for the identification of neoplasms of B-cell derivation (3). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Synonyms for antigen

CD3:T3, CD3 complex (4). CD20:L26 (5).

Summary and explanation

CD3:

CD3 consists of at least four different components (γ,δ,ε,ζ) of 20-28 kDa. On the lymphocyte cell surface, CD3 is non-covalently associated with the T-cell receptor (TCR). It is believed that the CD3 components of the TCR/CD3 complex mediate signal transduction upon antigen recognition by TCR (6).

CD3 is expressed by T cells in thymus, bone marrow, peripheral lymphoid tissue and blood (7,8). The only other normal cell type known to be labeled by antibodies to CD3, is Purkinje cells in the cerebellum (9). The CD3 antigen is first detectable in early thymocytes and its appearance probably represents one of the earliest signs of commitment to the T-cell lineage (7). In immature thymocytes the CD3 expression is solely cytoplasmic, membrane-associated CD3 appears subsequently upon cell maturation (7).

The majority of T-cell neoplasms express the CD3 antigen, while it is absent from non T-cell lymphoid malignancies (10). Consistent with the pattern of synthesis of the antigen in normal thymocytes, the earliest site where CD3 is detectable within neoplastic cells is in the cell cytoplasm (7). CD3 has been deemed an essential marker for the initial evaluation of chronic lymphoproliferative disorders (11). Large granular lymphocyte leukaemia of T-cell type (T-LGL) is characterized by the CD3+/CD57+/CD56- immunophenotype and clonal rearrangement of the T-cell receptor genes (12).

CD20:

CD20 is a transmembrane, non-glycosylated protein expressed on B-cell precursors and mature B cells, but is lost following differentiation into plasma cells (13). In resting B cells, CD20 appears in a 33 kDa non-phosphorylated form. After mitogen stimulation, CD20 becomes heavily phosphorylated (35-37 kDa isoforms), and it is a dominant phosphoprotein in activated B cells, B-cell lines, and hairy cell leukemias (5). The long N- and C-terminal ends of the protein are located on the cytoplasmic side of the membrane and only a minor portion of the protein is exposed on the cell surface (13). Antibodies reacting with CD20 cytoplasmic epitopes are designated CD20cy (5). It is suggested that CD20 plays a direct role in regulating the transmembrane conductive Ca^{2+} flux of B cells which indicates a possible function for CD20 as a regulator of proliferation and differentiation (13).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use polyclonal rabbit and monoclonal mouse antibody cocktail provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3

Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Clone L26, Isotype: IgG2a, kappa

Immunogen

CD3: Synthetic peptide comprising amino acids 156-168 from the cytoplasmic part of the human CD3ε–chain coupled to thyroglobulin (1)

CD20: Human tonsil B cells (14)

Specificity

CD3:

In Western blotting, the CD3 antibody detects bands of the expected molecular weights for CD3 antigens (2). The antibody recognizes CD3ε in both a T-cell line (Jurkat) and a natural killer cell line (NK11), but does not react with lysates prepared from several B cell lines (Raji, Ramos and JY), a myeloid cell line (U937) or a colon carcinoma cell line (Colo-205) (15).

In immunoprecipitation from Nonidet P40 lysates of surface-iodated T lymphoblasts, the antibody precipitates the γ (26 kDa), δ (21 kDa) and ε (19 kDa) chain of the CD3 molecule, similar to the precipitation pattern seen using the well-characterized monoclonal mouse anti-human CD3, clone UCHT1 (1).

In ELISA, the antibody labels the CD3 peptide used as immunogen.

CD20:

Anti-Human CD20cy, clone L26, was clustered as anti-CD20 at the Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5).

SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between ^{125}I-labeled tonsil cell lysate and the antibody shows reaction primarily with 30 kDa and 33 kDa polypeptides (14).

Studies using COS-1 cells transfected with cDNA encoding the CD20 molecule indicate that the antibody labels an intracytoplasmic epitope localized on the CD20 molecule (16).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2–8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody cocktail can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004).

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide.

Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004). The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Remove Autostainer slide rack with slides from the PT Link tank and immediately dip slides into a jar/tank (e.g., PT Link Rinse Station, Code PT109) containing diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Code K8007). Leave slides in Wash Buffer for 1-5 minutes.

Paraffin-embedded sections: Using aqueous mounting medium (Dako Faramount Code S3025) is the preferred coverslipping method. As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be air dried 1 hour at 60 °C, immersed in xylene and mounted using permanent mounting medium. Alcohol should be avoided with permanent mounting as it may diminish reactivity of the red chromogen.

Before mounting, the tissue sections should not dry out during the pre-treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ DuoFLEX Doublestain System, (Code K6807). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: DuoFLEX2 (200 µL dispense volume) or DuoFLEX3 (300 µL dispense volume)

Autoprogram: CD3CD20 (without counterstaining) or CD3CD20H (with counterstaining)

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in “Performance characteristics”.

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). After the staining procedure has been completed, the sections must be air dried, immersed in xylene and mounted using permanent mounting medium. Alcohol should be avoided with permanent mounting as it may diminish reactivity of the red chromogen.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include tonsil and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in “Performance characteristics” in all positive specimens.

Staining interpretation

CD3: Cells labeled by the CD3 antibody display red cytoplasmic and/or membrane staining.

CD20: B cells labeled by the CD20 antibody display brown staining of the cytoplasmic side of the cell surface membrane.

Performance characteristics

Normal tissues:

CD3:

The CD3 antibody labels T cells in various tissues including tonsil and colon. T cells in the interfollicular areas of tonsil show a moderate to strong staining reaction, whereas T cells in germinal centers of tonsil and in the colon epithelium show a weak to moderate red staining reaction.

CD20:

The CD20 antibody, in normal lymphoid tissue, labels germinal centre cells, mantle zone lymphocytes, and scattered interfollicular lymphocytes, but not T cells, histiocytes and plasma cells (17,18). No labeling is observed in epidermis, sebaceous glands, hair follicles and eccrine glands in the skin, follicular epithelium in the thyroid, pneumocytes and bronchial epithelium of the lung, and a large number of other normal non-lymphoid tissues tested (17). Mantle zone and germinal center B cells in tonsil show a moderate to strong staining reaction, whereas isolated B cells in liver show a weak to moderate brown staining reaction.

Abnormal tissues:

CD3:

The antibody labeled 73/96 T-cell neoplasms, including 7/9 lymphoblastic, 25/35 pleomorphic, 5/5 immunoblastic, 5/5 angioimmunoblastic lymphadenopathy-like, 2/2 T zone lymphomas, 19/19 mycosis fungoides/Sézary syndrome, 2/3 Lennert’s lymphomas, 4/13 Ki-1 positive anaplastic large cell lymphomas, 3/4 lymphomatoid papulosis, 1/1 coeliac-associated lymphoma (1). The antibody labeled 149/149 cases of T-cell (precursor) acute lymphoblastic leukaemias/lymphomas (ALL). In 131/149 cases, 100% of the cells were positive; in 14 cases between 50-90% of the cells were positive; and in 4 cases less than 50% of the cells were positive. No labeling was observed in 68/68 cases of B-cell (precursor) ALL, apart from reactive infiltrating T cells (2).

CD20:

The CD20 antigen was labeled in most of 131 B-cell neoplasms tested (3). Labeling with the antibody showed that in the differentiation of B cells, the CD20 antigen was not expressed on very immature lymphoid cells (0/6 acute undifferentiated leukemias), but began to be expressed on early maturational stages (14/34 common acute lymphoblastic and 7/9 pre-B acute lymphoblastic leukemias), and then, the CD20 antigen was fully expressed on mature B cells (15/15 chronic lymphocytic, 3/3 prolymphocytic, 3/3 hairy cell, 6/7 lymphosarcoma cell leukemias, and 45/46 B-cell malignant lymphomas including Burkitt’s, Waldenström’s, and immunoblastic B-cell lymphomas). The CD20 antigen disappears on plasma cells, and only 1/2 plasma cell leukaemias and 0/12 myelomas were labeled by the antibody (3). Other studies have provided comparable results showing positive labeling of 44/44 large cell and immunoblastic B-cell lymphomas (17), and all of 40 B-cell lymphomas, with the exception of common acute lymphoblastic leukemias and malignant plasmacytic lymphoma. In Hodgkin’s disease, strong surface membrane staining of Reed-Sternberg cells was observed in 9/27 cases (18). Of lymphoproliferative diseases of T-cell lineage, 0/73 were labeled by the antibody (3), whereas other studies showed 1/18 (18) and 1/111 (19) positive cases. Rare cases of CD20-positive peripheral T-cell lymphomas have been reported (18, 19).

Français

Réf. IK002

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Le cocktail DuoFLEX, constitué d'un anticorps polyclonal de lapin anti-CD3 humain et d'un anticorps monoclonal de souris anti- CD20cy humain, clone L26, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est prévu pour être utilisé en immunohistochimie avec les appareils Dako Autostainer/Autostainer Plus. L'anticorps polyclonal de lapin anti-CD3 humain permet l'identification de lymphocytes T et des néoplasmes associés (1, 2). L'anticorps anti-CD20cy humain marque les cellules de la lignée des lymphocytes B et facilite l’identification des néoplasmes dérivés des lymphocytes B (3). L’interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d’autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Synonymes de l'antigène

Complexe CD3:T3, CD3 (4). CD20 : L26 (5).

Résumé et explication

CD3 :

Le CD3 comporte au moins quatre composants différents (γ,δ,ε,ζ) de 20 à 28 kDa. À la surface des lymphocytes, le CD3 est lié de manière non covalente au récepteur des lymphocytes T (TCR). On pense que les composants du CD3 du complexe TCR/CD3 interviennent dans la transduction du signal lors de la reconnaissance de l'antigène par le TCR (6).

Le CD3 est exprimé par les lymphocytes T dans le thymus, la moelle osseuse, le tissu lymphoïde périphérique et le sang (7,8). Le seul autre type de cellule normal connu pour être marqué par les anticorps anti-CD3 est les cellules de Purkinje du cervelet (9). L'antigène CD3 est d'abord détectable dans les thymocytes précoces et sa présence constitue probablement l'un des premiers signes d'appartenance à la lignée des lymphocytes T(7). Dans les thymocytes immatures, l'expression du CD3 est uniquement cytoplasmique et le CD3 associé à la membrane apparaît par la suite, après la maturation cellulaire (7).

La majorité des néoplasmes à lymphocytes T exprime l'antigène CD3, alors qu'il est absent des tumeurs lymphoïdes non à lymphocytes T(10). Conformément au schéma de synthèse de l'antigène des thymocytes normaux, le premier site où le CD3 est détectable au sein des cellules néoplasiques est le cytoplasme cellulaire(7). Le CD3 s'est révélé un marqueur essentiel de l'évaluation initiale des troubles lymphoprolifératifs chroniques(11). La leucémie à grands lymphocytes T granuleux (T-LGL) se caractérise par l'immunophénotype CD3+/CD57+/CD56- et la réorganisation clonale des gènes des récepteurs de lymphocytes T (12).

CD20 :

Le CD20 est une protéine transmembranaire, non glycosylée exprimée sur les précurseurs des lymphocytes B et les lymphocytes B matures, mais qui est perdue après la différenciation en plasmocytes (13). Dans les lymphocytes B au repos, le CD20 apparaît sous une forme non phosphorylée de 33 kDa. Après stimulation mitogène, le CD20 devient fortement phosphorylé (isoformes de 35 à 37 kDa), et est une phosphoprotéine dominante dans les lymphocytes B activés, les lignées de lymphocytes B et les leucémies à tricholeucocytes (5). Les extrémités N-terminale et C-terminale longues de la protéine sont situées sur le côté cytoplasmique de la membrane et seule une partie mineure de la protéine est exposée sur la surface cellulaire (13). Les anticorps réagissant avec les épitopes cytoplasmiques du CD20 sont désignés CD20cy (5). Il semble que le CD20 joue un rôle direct dans la régulation du flux transmembranaire Ca^{2+} conducteur de lymphocytes B, ce qui indiquerait que le CD20 agit comme régulateur de prolifération et de différenciation (13).

Se reporter aux *« Instructions générales de coloration immunohistochimique »* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures d'IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillon, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Cocktail d'anticorps polyclonal de lapin et monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Anticorps polyclonal de lapin anti-CD3 humain

Anticorps monoclonal de souris anti-CD20cy humain, clone L26, Isotype : IgG2a, kappa

Immunogène

CD3 : peptide de synthèse comprenant 156 à 168 acides aminés provenant de la partie cytoplasmique de la chaîne du CD3ε– humain couplée à la thyroglobuline (1).

CD20 : lymphocytes B d'amygdale humaine (14)

Spécificité

CD3 :

Lors des analyses par Western blot, l'anticorps anti-CD3 détecte les bandes de poids moléculaire attendu pour les antigènes CD3 (2). L'anticorps reconnaît le CD3ε tant dans une lignée de lymphocytes T (Jurkat) que dans une lignée de cellules tueuses naturelles (NK11) mais ne réagit pas aux lysats préparés à partir de plusieurs lignées de lymphocytes B (Raji, Ramos et JY), d'une lignée de cellules myéloïdes (U937) ou d'une lignée de cellules de carcinome du côlon (Colo-205) (15).

Lors de l'immunoprécipitation à partir de lysats Nonidet P40 de lymphoblastes T à surface iodée, l'anticorps précipite les chaînes γ (26 kDa), δ (21 kDa) and ε (19 kDa) de la molécule CD3, de manière similaire au schéma de précipitation observé lors de l'utilisation d'un anticorps monoclonal de souris bien caractérisé, dirigé contre le CD3 humain, clone UCHT1 (1).

Lors d'un test ELISA, l'anticorps marque le peptide CD3 utilisé comme immunogène.

CD20 :

L'anticorps anti-CD20cy humain, clone L26 a été classé comme un anti-CD20 à la Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Cinquièmes Conférence et Atelier internationaux sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains) (5).

L'analyse SDS-PAGE d'immunoprécipités formés entre le lysat cellulaire d'amygdale marqué à l'iode^{125} et l'anticorps indique une réaction aux polypeptides de 30 kDa et 33 kDa principalement (14).

Les études utilisant des cellules COS-1 transfectées par l'ADNc codant la molécule CD20, indiquent que l'anticorps marque un épitope intracytoplasmique localisé sur la molécule CD20 (16).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
4. Porter un équipement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date limite de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patients. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes tissulaires incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec un démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x), (Réf. K8004).

Coupes déparaffinées : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine puis déparaffinées est recommandé à l'aide du Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link.

Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice pour la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x), (Réf. K8004). Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : température de préchauffage : 65 °C ; température et durée du déma squage d'épitope : 97 °C pendant 20 (±1) minutes ; refroidissement à 65 °C. Retirer chaque portoir à l ames Autostainer contenant les lames de la cuve du PT Link et plonger immédiatement les lames dans un récipient/une cuve (par ex., PT Link Rinse Station, Réf. PT109) contenant du tampon de lavage EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Réf. K8007), dilué à température ambiante. Laisser les lames dans le tampon de lavage pendant 1 à 5 minutes.

Coupes incluses en paraffine : le milieu de montage aqueux (Dako Faramount Réf. S3025) est la méthode privilégiée d'application de lamelles de protection. Comme préparation alternative des échantillons, le déparaffinage et la restauration de l'épitope peuvent être réalisés dans le PT Link à l'aide d'une procédure modifiée. Se référer aux instructions du Guide d'utilisation du PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être séchées à l'air à 60 °C durant 1 heure, immergées dans du xylène et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent. Éviter d'utiliser de l'alcool comme milieu de montage permanent car il peut diminuer la réactivité de la solution chromogène rouge.

Avant montage, les coupes tissulaires ne doivent pas sécher lors du prétraitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique qui suit. Pour une meilleure adhérence des coupes tissulaires sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames Dako FLEX IHC Microscope Slides (Réf. K8020).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ DuoFLEX Doublestain System, (Réf. K6807). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : DuoFLEX2 (volume de distribution 200 µL) ou DuoFLEX3 (volume de distribution 300 µL)

Programme automatique : CD3CD20 (sans contre-coloration) ou CD3CD20H (avec contre-coloration)

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la reprogrammation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). Une fois que la procédure de coloration est terminée, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent. Éviter d'utiliser de l'alcool comme milieu de montage permanent car il peut diminuer la réactivité de la solution chromogène rouge.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Le tissu de contrôle positif doit comprendre l'amygdale et les cellules/structures doivent présenter les schémas de réaction décrits pour ces tissus à la section « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs.

Interprétation de la coloration

CD3 : les cellules marquées par l'anticorps anti-CD3 présentent une coloration rouge, cytoplasmique et/ou membranaire.

CD20 : les lymphocytes B marqués par l'anticorps anti-CD20 montrent une coloration brune du côté cytoplasmique de la membrane de surface cellulaire.

Caractéristiques de performance

Tissus sains :

CD3 :

L'anticorps anti-CD3 marque les lymphocytes T dans divers tissus, y compris l'amygdale et le côlon. Les lymphocytes T des zones interfolliculaires des amygdales présentent une coloration modérée à forte, tandis que la coloration rouge des lymphocytes T des centres germinatifs de l'amygdale et de l'épithélium du côlon est faible à modérée.

CD20 :

Dans le tissu lymphoïde sain, l'anticorps anti-CD20 marque les cellules des centres germinatifs, les lymphocytes de la zone du manteau et les lymphocytes interfolliculaires disséminés, mais pas les lymphocytes T, les histiocytes ni les plasmocytes (17, 18). Aucun marquage n'est observé dans l'épiderme, les glandes sébacées, les follicules pileux et les glandes eccrines de la peau, l'épithélium folliculaire de la thyroïde, les pneumocytes et l'épithélium bronchique du poumon, ainsi qu'un grand nombre d'autres tissus non lymphoïdes sains testés (17). Les lymphocytes B de la zone du manteau et du centre germinatif des amygdales présentent une coloration modérée à forte, tandis que la coloration brune des lymphocytes B isolés dans le foie est faible à modérée.

Tissus tumoraux :

CD3 :

L'anticorps a marqué 73 sur 96 néoplasmes à lymphocytes T, dont 7 lymphoblastiques sur 9, 25 pléomorphes sur 35, 5 immunoblastiques sur 5, 5 angio-immunoblastiques de type lymphadénopathie sur 5, 2 lymphomes de la zone T sur 2, 19 cas sur 19 de mycose fongoïde/syndrome de Sézary, 2 lymphomes de Lennert sur 3, 4 lymphomes à grandes cellules anaplasiques positifs à la Ki-1 sur 13, 3 papuloses lymphomatoïdes sur 4, et le seul lymphome associé à une maladie cœliaque (1). L'anticorps a marqué 149 cas sur 149 de lymphomes/leucémies lymphoblastiques aiguës à lymphocytes T (précurseurs) (LAL). Dans 131 cas sur 149, 100 % des cellules étaient positives ; dans 14 cas entre 50 et 90 % des cellules étaient positives ; et dans 4 cas, moins de 50 % des cellules étaient positives. Aucun marquage n'a été observé dans 68 cas sur 68 de LAL à lymphocytes B (précurseurs), hormis celui des lymphocytes T infiltrants réactifs (2).

CD20 :

L'antigène CD20 était marqué sur la plupart des 131 néoplasmes à lymphocytes B testés (3). Le marquage avec l'anticorps montre que, dans la différenciation des lymphocytes B, l'antigène CD20 n'est pas exprimé sur les cellules lymphoïdes très immatures (0 leucémie aiguë non différenciée sur 6), mais commence à s'exprimer aux stades précoces de maturation (14 leucémies lymphoblastiques aiguës courantes sur 34 et 7 leucémies lymphoblastiques aiguës à pré-lymphocytes B sur 9), puis, l'antigène CD20 est entièrement exprimé sur les lymphocytes B matures (15 leucémies lymphocytaires chroniques sur 15, 3 leucémies prolymphocytaires sur 3, 3 leucémies à tricholeucocytes sur 3, 6 lymphosarcomes sur 7, et 45 lymphomes malins à lymphocytes B sur 46, dont les lymphomes de Burkitt, de Waldenström et les lymphomes immunoblastiques à lymphocytes B). L'antigène CD20 disparaît des plasmocytes et seulement 1 cas de leucémie à cellules plasmatiques sur 2 et aucun cas de myélome sur 12 ont été marqués par l'anticorps (3). D'autres études ont fourni des résultats comparables indiquant un marquage positif de 44 lymphomes immunoblastiques à lymphocytes B sur 44 et de lymphomes à grande cellules (17), et l'ensemble des 40 cas de lymphomes à lymphocytes B, à l'exception des leucémies lymphoblastiques aiguës courantes et des lymphomes malins plasmocytaires. Dans la maladie de Hodgkin, une forte coloration de la surface membranaire des cellules de Reed-Sternberg a été observée dans 9 cas sur 27 (18). Parmi les maladies lymphoprolifératives à lignée des lymphocytes T, 0 cas sur 73 ont été marqués par l'anticorps (3), alors que d'autres études ont montré 1 cas positif sur 18 (18) et 1 cas positif sur 111 (19). De rares cas de lymphomes périphériques à lymphocytes T positifs au CD20 ont été signalés (18, 19).

Deutsch

Code-Nr. IK002

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Der Antikörper-Cocktail DuoFLEX, der aus polyklonalem Kaninchen-Anti-Human-CD3 und monoklonalem Maus-Anti-Human-CD20cy, Klon L26 (Dako Autostainer/Autostainer Plus) besteht, ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Der polyklonale Kaninchen-Anti-Human-CD3-Antikörper dient der Identifizierung von T-Zellen und verwandten Neoplasien (1,2). Der Anti-Human-CD20cy-Antikörper markiert Zellen der B-Zelllinie und dient zur Identifizierung von Neoplasmen mit B-Zell-Abstammung (3). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Synonyme für das Antigen

CD3: T3, CD3-Komplex (4). CD20: L26 (5).

Zusammenfassung und Erklärung

CD3:

CD3 besteht aus mindestens vier verschiedenen Komponenten (γ,δ,ε,ζ) von 20–28 kDa. An der Oberfläche der Lymphozytenzelle ist CD3 nichtkovalent an den T-Zellenrezeptor (TCR) gebunden. Man vermutet, dass die CD3-Komponenten des TCR/CD3-Komplexes bei der Erkennung des Antigens durch den TCR die Signalübertagung vermitteln (6).

CD3 wird von T-Zellen in Thymus, Knochenmark, peripherem lymphoiden Gewebe und in Blut exprimiert (7,8). Die einzigen anderen normalen Zellen, von denen bekannt ist, dass sie durch Antikörper gegen CD3 markiert werden, sind die Purkinje-Zellen im Kleinhirn (9). Das CD3-Antigen ist zunächst in frühen Thymozyten nachweisbar und sein Auftreten ist vermutlich eines der frühesten Zeichen einer Festlegung auf die T-Zell-Reihe (7). Bei unreifen Thymozyten ist die CD3-Expression ausschließlich zytoplasmatisch und membranassoziiertes CD3 tritt anschließend bei Zellreifung auf (7).

Die Mehrheit der T-Zell-Neoplasmen exprimiert das CD3-Antigen, während es bei nicht-T-Zell-lymphoiden Malignitäten fehlt (10). In Übereinstimmung mit dem Muster der Antigensynthese bei normalen Thymozyten ist der früheste Ort, an dem CD3 in neoplastischen Zellen nachweisbar ist, das Zellzytoplasma (7). CD3 gilt als wesentlicher Marker für die erste Bewertung chronischer lymphoproliferativer Störungen (11). Die grobgranuläre T-Zellenleukämie (T-LGL) ist durch den CD3+/CD57+/CD56-Immunphänotyp und durch die klonale Neuanordnung der T-Zellrezeptorgene charakterisiert (12).

CD20 :

CD20 ist ein transmembranöses, nicht-glykosyliertes Protein, das in B-Zell-Vorläufern und reifen B-Zellen exprimiert wird, jedoch nach der Differenzierung zu Plasmazellen verloren geht (13). In ruhenden B-Zellen erscheint CD20 in 33 kDa schwerer, nicht phosphorylierter Form. Nach mitogener Stimulation wird CD20 stark phosphoryliert (35–37 kDa schwere Isoformen) und ist bei aktivierten B-Zellen, B-Zelllinien und Haarzellenleukämien ein dominantes Phosphoprotein (5). Die langen N- und C-terminalen Enden des Proteins sind auf der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert und nur ein kleiner Teil des Proteins liegt auf der Zelloberfläche (13). Mit den zytoplasmatischen CD20-Epitopen reagierende Antikörper werden als CD20cy bezeichnet (5). Es wird nahe gelegt, dass CD20 eine direkte Rolle bei der Regulierung des transmembranen konduktiven Ca^{2+}-Flusses der B-Zellen spielt, was auf eine mögliche Funktion von CD20 als Regulator der Proliferation und Differenzierung verweist (13).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger Cocktail aus polyklonalem Kaninchen- und monoklonalem Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L Natriumazid enthält.

Polyklonaler Anti-Human-CD3

Monoklonaler Maus-Anti-Human-CD20cy, Klon L26, Isotyp: IgG2a, kappa

Immunogen

CD3: Synthetisches Peptid mit Aminosäuren 156 bis 168 aus dem zytoplasmatischen Teil der an Thyroglobulin gekoppelten menschlichen CD3ε-Kette (1).

CD20: B-Zellen von menschlichem Mandelgewebe (14)

Spezifität

CD3:

Beim Western-Blotting weist CD3 Banden der erwarteten relativen Molekülmassen für CD3-Antigene nach (2). Der Antikörper erkennt CD3ε sowohl in einer T-Zelllinie (Jurkat) als auch in einer NK-Zelllinie (NK11), reagiert aber nicht mit Lysaten aus verschiedenen B-Zelllinien (Raji, Ramos und JY), einer myeloischen Zelllinie (U937) oder einer Dickdarmkrebszelllinie (Colo-205) (15).

In der Immunpräzipitation aus Nonidet-P40-Lysaten von oberflächenjodierten T-Lymphoblasten präzipitiert der Antikörper die γ- (26 kDa), δ- (21 kDa) und ε- (19 kDa) Kette des CD3-Moleküls ähnlich dem Präzipitationsmuster beim deutlich charakterisierten, monoklonalen antihumanen Maus-CD3, Klon UCHT1 (1).

Beim ELISA-Verfahren markiert der Antikörper das als Immunogen genutzte CD3-Peptid.

CD20:

Anti-Human CD20cy, Klon L26, wurde bei dem/der Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5. Internationale/r Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) als Anti-CD20 geclustert (5).

Die SDS-PAGE-Analyse der Immunpräzipitate, die zwischen ^{125}I-markiertem Mandelzelllysat und dem Antikörper gebildet wurden, zeigte eine primäre Reaktion mit den 30 kDa und 33 kDa schweren Polypeptiden (14).

Studien unter Verwendung von COS-1-Zellen, die mit das CD20-Molekül kodierender cDNA transfiziert wurden, deuten darauf hin, dass der Antikörper ein intrazytoplasmatisch lokalisiertes Epitop auf dem CD20-Molekül markiert (16).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Anwendung durch Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.

3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe

Der Antikörper-Cocktail eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Es ist eine Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER-Verfahren) erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) erzielt werden.

Entparaffinierte Schnitte: Die Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte sollte mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) erfolgen. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch.

Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) durchführen. Für PT Link sollten die folgenden Parameter verwendet werden: Vorwärmtemperatur: 65 °C; Temperatur und Zeit für Epitopdemaskierung: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen. Das Autostainer-Objektträgergestell mit den Objektträgern aus dem PT Link-Behälter herausnehmen und die Objektträger sofort in einen Behälter (z.B. PT Link Rinse Station, Code-Nr. PT109) mit verdünntem, auf Zimmertemperatur gebrachtem EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x), (Code-Nr. K8007) eintauchen. Die Objektträger für 1–5 Minuten im Wash Buffer belassen.

Paraffineingebettete Schnitte: Die bevorzugte Eindeckmethode ist die Verwendung eines wässrigen Eindeckmediums (Dako Faramount, Code-Nr. S3025). Alternativ können Entparaffinierung und Epitopdemaskierung im PT Link unter Verwendung eines modifizierten Verfahrens durchgeführt werden. Weitere Informationen finden Sie im PT Link-Benutzerhandbuch. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte bei 60 °C für 1 Stunde luftgetrocknet, in Xylol getaucht und mit einem permanenten Eindeckmedium eingedeckt werden. Beim permanenten Eindecken sollte Alkohol vermieden werden, da es die Reaktionsfähigkeit des roten Chromogens einschränken kann.

Vor dem Eindecken und während der Vorbehandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren

Als Visualisierungssystem wird EnVision™ DuoFLEX Doublestain System (Code-Nr. K6807) empfohlen. Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Matrix-Protokoll: DuoFLEX2 (200 µL Abgabevolumen) oder DuoFLEX3 (300 µL Abgabevolumen)

Autoprogram: CD3CD20 (ohne Gegenfärbung) oder CD3CD20H (mit Gegenfärbung)

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte luftgetrocknet, in Xylol eingetaucht und unter Verwendung eines permanenten Eindeckmediums eingedeckt werden. Beim permanenten Eindecken sollte Alkohol vermieden werden, da es die Reaktionsfähigkeit des roten Chromogens einschränken kann.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Als positive Kontrolle sollte Mandelgewebe verwendet werden, und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen.

Auswertung der Färbung

CD3: Mit dem CD3-Antikörper markierte Zellen weisen eine rote zytoplasmatische und/oder Membranfärbung auf.

CD20: Mit dem CD20-Antikörper markierte B-Zellen weisen eine braune Färbung an der zytoplasmatischen Seite der Zelloberflächenmembran auf.

Leistungsmerkmale

Gesunde Gewebe:

CD3:

Der CD3-Antikörper markiert T-Zellen in verschiedenen Geweben einschließlich Mandeln und Dickdarm. T-Zellen

in den interfollikulären Bereichen der Tonsillen zeigen eine mäßige bis starke Farbreaktion, während T-Zellen in den Keimzentren der Mandeln und im Kolonepithel schwach bis mäßig rot angefärbt werden.

CD20:

Bei gesundem lymphoidem Gewebe markiert der CD20-Antikörper Zellen des Keimzentrums, Lymphozyten der Mantelzone sowie einzelne interfollikuläre Lymphozyten, jedoch nicht T-Zellen, Histiozyten und Plasmazellen (17,18). Es konnte keine Markierung der Epidermis, der Talgdrüsen, Haarfollikel und ekkrinen Drüsen der Haut, des Schilddrüsenfollikelepithels, der Pneumozyten und des Bronchialepithels der Lunge wie auch einer großen Anzahl anderer untersuchter nicht-lymphoider Gewebe festgestellt werden (17). Zellen der Mantelzone und B-Zellen des Keimzentrums in Mandelgewebe weisen eine mäßige bis starke Färbereaktion auf, während isolierte B-Zellen in der Leber schwach bis mäßig braun angefärbt werden.

Pathologische Gewebe:

CD3:

Der Antikörper markierte 73/96 T-Zellneoplasmen, einschließlich 7/9 lymphoblastischen, 25/35 pleomorphen, 5/5 immunoblastischen, 5/5 angioimmunoblastischen lymphadenopathieartigen, 2/2 T-Zonen-Lymphomen, 19/19 Mycosis fungoides/Sézary-Syndrom, 2/3 Lennert-Lymphomen, 4/13 Ki-1 positiven, anaplastischen großzelligen Lymphomen, 3/4 lymphomatoiden Papulosis, 1/1 zöliakieassoziiertem Lymphom (1). Der Antikörper markierte 149 von 149 Fällen der auf die T-Zellreihe (Vorläufer) zurückgehenden akuten lymphoblastischen Leukämien/Lymphome (ALL). In 131 von 149 Fällen testeten 100% der Zellen positiv, in 14 Fällen erwiesen sich zwischen 50–90% der Zellen als positiv und in 4 Fällen wurden weniger als 50% der Zellen positiv angefärbt. Mit Ausnahme reaktiver infiltrierender T-Zellen wurde bei 68 von 68 Fällen der auf die B-Zelllinie (Vorläufer) zurückgehenden ALL keine Markierung festgestellt (2).

CD20:

In den meisten von 131 getesteten B-Zell-Neoplasien wurde das CD20-Antigen markiert (3). Die Markierung mit dem Antikörper zeigte, dass während der Differenzierung der B-Zellen das CD20-Antigen auf sehr unreifen lymphoiden Zellen nicht exprimiert wurde (0/6 akuten nicht differenzierten Leukämien), dass seine Expression jedoch in den frühen Reifungsstadien begann (14/34 akuten lymphoblastischen und 7/9 akuten Prä-B-Lymphoblastenleukämien). Später wird das CD20-Antigen voll auf reifen B-Zellen exprimiert (15/15 chronischen lymphozytischen, 3/3 prolymphozytischen, 3/3 Haarzellen-, 6/7 Lymphosarkomzell-Leukämien und 45/46 malignen B-Zell-Lymphomen, einschließlich Burkitt-, Waldenström- und Immunoblasten-B-Zell-Lymphome). Das CD20-Antigen ist auf Plasmazellen nicht mehr vorhanden und lediglich 1/2 Plasmazell-Leukämien und 0/12 Myelomen wurden vom Antikörper markiert (3). Andere Studien lieferten vergleichbare Befunde und erbrachten positive Markierung bei 44/44 Großzellen- und Immunoblasten-B-Zell-Lymphomen (17) sowie bei allen 40 B-Zell-Lymphomen, außer bei akuten lymphoblastischen Leukämien und plasmazytärem malignem Lymphom. Bei 9/27 Fällen von Morbus Hodgkin wurde eine starke Färbung der Oberflächenmembran der Reed-Sternberg-Zellen beobachtet (18). Bei lymphoproliferativen Erkrankungen der T-Zelllinie konnte bei 0/73 Fällen eine Markierung mit dem Antikörper festgestellt werden (3), während andere Studien über 1/18 (18) bzw. 1/111 (19) positiven Fällen berichteten. Es wurde über seltene Fälle von CD20-positiven peripheren T-Zell-Lymphomen berichtet (18,19).

References
Bibliographie
Literaturhinweise

1. Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, et al. Detection of cells in paraffin wax embedded tissue, using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. J Clin Pathol 1989; 42:1194-1200
2. Pilozzi E, Pulford K, Jones M, Müller-Hermelink H-K, Falini B, Ralfkiaer E, et al. Co-expression of CD79a (JCB117) and CD3 by lymphoblastic lymphoma. J Pathol 1988; 186:140-3
3. Takami T, Qi C-F, Yamada T, Yamashina M, Kon S-I, Ishii Y, et al. B20.3. Reactivity and specificity of L26 (pan-B cell mAb) on 322 cases of fresh and paraffin-embedded lymphoproliferative diseases. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 134-6
4. CD guide In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1111
5. Zhou L-J, Tedder TF. CD20 workshop panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 511-4
6. Jacobs H. Pre-TCR/CD3 and TCR/CD3 complexes: decamers with differential signalling properties? Immunol Today 1997; 18:565-9
7. Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. J Immunol 1987; 138:648-55
8. Tunnacliffe HA, Olsson C, Traunecker A, Krissansen GW, Karjalainen K, De la Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 295-6
9. Garson JA, Beverley PC, Coakham HB, Harper EI. Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurones of many species. Nature 1982; 298:375-7

10. Erber WN, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labeling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. Lancet 1986;i: 761-5
11. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. Cytometry 2001; 46:23-7
12. Kingreen D, Siegert W. Chronic lymphatic leukemias of T and NK cell type. Leukemia 1997; 11 Suppl 2:S46-9
13. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B-lymphocytes. Immunology Today 1994; 15:450-4
14. Ishii Y, Takami T, Yuasa H, Takei T, Kikuchi K. Two distinct antigen systems in human B-lymphocytes: identification of cell surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies. Clin Exp Immunol 1984; 58:183-92
15. Lanier LL, Chang C, Spitz H, Pillips JH. Expression of cytoplasmic CD3ε proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3γ, δ, ε complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. J Immunol 1992; 149:1876-80
16. Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, Verhoeven MAJ, van Dongen JJM. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B cell-associated CD20 antigen. Am J Pathol 1990; 136:1215-22
17. Cartun RW, Coles FB, Pastuszak WT. Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B cell lymphomas. A sensitive and specific marker applicable to formalin- and B5-fixed, paraffin-embedded tissues. Am J Pathol 1987;129:415-21
18. Norton AJ, Isaacson PG. Monoclonal antibody L26: an antibody that is reactive with normal and neoplastic B lymphocytes in routinely fixed and paraffin wax embedded tissue. J Clin Pathol 1987; 40:1405-12
19. Blakolmer K, Vesely M, Kummer JA, Jurecka W, Mannhalter C, Chott A. Immunoreactivity of B cell markers (CD79a, L26) in rare cases of extranodal cytotoxic peripheral T- (NK/T-) cell lymphomas. Mod Pathol 2000; 13:766-72

REF Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	Consult instructions for use *Consulter les instructions d'utilisation* *Gebrauchsanweisung beachten*
Manufacturer Fabricant Hersteller	LOT Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
EC REP Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU		IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum

PT0039/Rev C

Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

Edition 03/09